

Preservação de Amostras e Extração de DNA de *Spodoptera frugiperda*



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 68

Preservação de Amostras e Extração de DNA de *Spodoptera frugiperda*

Isabel Regina Prazeres de Souza
Beatriz de Almeida Barros
Ubiraci Gomes de Paula Lana
Henrique Albano Rafael
Simone Martins Mendes
Natália Alves Leite

Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2013

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 Km 45

Caixa Postal 151

CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG

Fone: (31) 3027-1100

Fax: (31) 3027-1188

Home page: www.cnpms.embrapa.br

E-mail: cnpms.sac@embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Sidney Netto Parentoni

Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau

Membros: Dagma Dionísia da Silva, Paulo Eduardo de Aquino Ribeiro,

Monica Matoso Campanha, Maria Marta Pastina, Rosângela Lacerda

de Castro e Antonio Claudio da Silva Barros

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro

Tratamento de ilustrações: Tânia Mara Assunção Barbosa

Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa

Foto(s) da capa: Alexandre Esteves Neves

1ª edição

1ª impressão (2013): on line

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Milho e Sorgo**

Preservação de amostras e extração de DNA de *Spodoptera*

frugiperda / Isabel Regina Prazeres de Souza ... [et al.]. – Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2013.

20 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1679-0154; 68).

1. Genética molecular. 2. Praga de planta. 3. Lagarta. 4. *Zea mays*. L. Souza, Isabel Regina Prazeres de. II. Série.

CDD 572.86 (21. ed.)

© Embrapa 2013

Sumário

Introdução	4
Metodologia	7
Resultados e Discussão	10
Conclusões	11
Agradecimentos	12
Referências	12

Preservação de Amostras e Extração de DNA de *Spodoptera frugiperda*

Isabel Regina Prazeres de Souza¹

Beatriz de Almeida Barros²

Ubiraci Gomes de Paula Lana³

Henrique Albano Rafael⁴

Simone Martins Mendes⁵

Natália Alves Leite⁶

Introdução

A lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797), tem ampla distribuição geográfica, ocorre o ano todo em várias culturas hospedeiras, como o milho (*Zea mays* L.); o sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench); o algodão (*Gossypium herbaceum* L.); a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.); a soja (*Glycine max* (L.) Merrill) e as pastagens, como *Panicum maximum* Jacq. Cv. Tanzania e capim braquiária. Por ser uma praga polífaga é comum em diferentes agrossistemas. Pogue (2002) listou mais de 100 espécies de plantas consideradas hospedeiras dessa espécie-praga. No

¹Eng.-Agr., PhD. em Plant Science, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, isabel.prazeres@embrapa.br

²Bióloga, Dra em Genética e Melhoramento, Analista da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, beatriz.barros@embrapa.br

³Químico, Dr. em Genética, Analista da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, ubiraci.lana@embrapa.br

⁴Graduando em Ciências Biológicas, Centro universitário de Sete Lagoas, Sete Lagoas, MG, henriquealbanorafael@hotmail.com

⁵Eng.-Agr., Dra. em Entomologia, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, simone.mendes@embrapa.br

⁶Eng.-Agr., Doutoranda em Entomologia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP, alvesnat@gmail.com

Autor correspondente, E-mail: isabel.prazeres@embrapa.br

milho, essa é a principal praga, cujas perdas podem variar de 17 a 34%, dependendo da fase de infestação na cultura. Além disso, como esta espécie fica abrigada no cartucho da planta do milho, o seu controle torna-se mais difícil e, conseqüentemente, oneroso (BOREGAS et al., 2013).

Em estudos genético-moleculares, o componente mais crítico é a obtenção de DNA de boa qualidade (SAHA et al., 1997). Por ser a *S. frugiperda* uma praga de relevante importância e visando contribuir com os estudos que empregam técnicas laboratoriais que necessitem da extração de DNA, elaboramos este documento com os resultados que obtivemos a partir de testes de coleta e preservação da lagarta e de extração de seu DNA genômico.

Inicialmente, avaliou-se a eficiência de preservação das lagartas em diferentes estágios de desenvolvimento e em duas concentrações de etanol, 70% e 100% (v/v), por causa da necessidade de se defasar no tempo a extração de DNA quando se tem um grande número de indivíduos ou em casos específicos em que seja necessário o transporte por período longo antes da extração.

Um procedimento rápido, simples e robusto é um pré-requisito importante para qualquer método de extração de DNA e suas aplicações subsequentes. A maioria dos protocolos publicados para extração de DNA de insetos são procedimentos baseados em SDS/proteinase K (HENRY et al., 1990; ALJANABI; MARTINEZ, 1997; REINEKE et al., 1998; HILL; GUTIERREZ, 2003; JUEN; TRAUGOTT, 2006), ou kits disponíveis comercialmente. Entretanto, quando os insetos se alimentam de vegetais, a presença de compostos fenólicos compromete o isolamento de

DNA de boa qualidade porque eles se ligam covalentemente ao DNA extraído, inibindo as reações enzimáticas posteriores. Compostos antioxidantes, como β -mercaptoetanol, polivinil-pirrolidona (PVP) e albumina do soro bovino (BSA), são comumente utilizados para contornar esse problema (CLARK, 1997).

Altas concentrações de β -mercaptoetanol (2 a 5%) reduzem a oxidação de compostos fenólicos e o subsequente escurecimento das preparações de DNA (HORNE et al., 2004; PUCHOOA, 2004; LI et al., 2007). Já o PVP forma um complexo com compostos fenólicos que se coprecipita com os debris durante a lise celular (KIM et al., 1997), podendo ser eliminado da preparação pois se acumula entre a fase aquosa e a orgânica durante a desproteinização (CALDERÓN-CORTÉS et al., 2010). A adição de BSA ao tampão de extração apresenta muitos benefícios. Além de ser um composto absorvente de polifenóis (COUCH; FRITZ, 1990), ele previne a desnaturação de proteínas e liga-se a moléculas inibitórias que são liberadas durante o processo de extração (SUL; KORBAN, 1996).

Neste trabalho empregou-se a metodologia de extração de DNA descrita por Rogers e Bendich (1988), com modificações. Dentre estas se inclui aumento na concentração de β -mercaptoetanol, além do acréscimo de PVP e BSA no tampão de extração das amostras.

Metodologia

Teste de Preservação das Lagartas

Foram testadas duas estratégias para preservação dos insetos buscando facilitar a coleta, o transporte e o armazenamento, e assegurar a integridade do tecido para posterior extração do DNA. Lagartas em diferentes estágios de desenvolvimento (**Tabela 1**) foram dispostas de cabeça para baixo em microtubo de 2 mL, cujo volume foi preenchido com etanol absoluto ou etanol 70% (v/v) (**Figuras 1 A e B**). As amostras foram mantidas em geladeira a 4 °C e submetidas a trocas diárias do etanol, durante três dias consecutivos. Após este período, as amostras foram mantidas no etanol na mesma concentração da solução de troca e armazenadas em freezer a -20 °C. Após dez dias, as amostras foram retiradas das soluções de preservação e utilizadas as seguintes partes do inseto para extração do DNA: cabeça, corpo sem intestino ou o inseto inteiro, quando este apresentava muito pouca biomassa que impedisse a retirada do intestino (**Figuras 2 A e B**).



Figura 1. Preservação de lagarta para extração de DNA. (A) Lagarta com cabeça posicionada para baixo sendo disposta em microtubo de 2 mL (B) Volume do tubo preenchido com a solução de etanol.

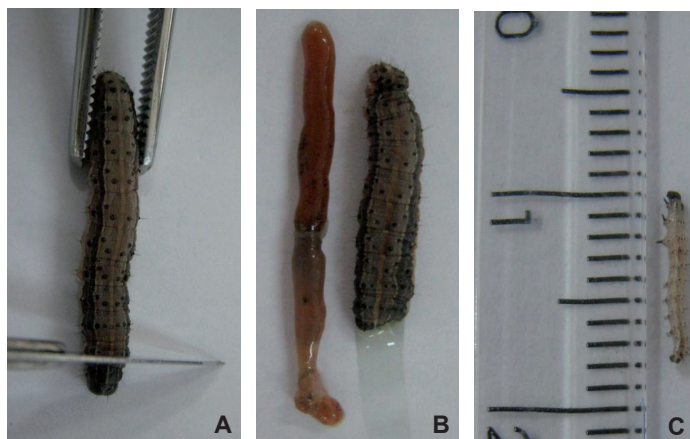


Figura 2. Seccionamento da lagarta. (A) Detalhamento da retirada da cabeça, (B) Intestino e corpo, (C) lagarta pequena com pouca biomassa.

Tabela 1. Identificação, biomassa e comprimento do inseto, concentração da solução de preservação e parte do inseto utilizada para extração de DNA.

Inseto No.	Biomassa (mg)	Comprimento (cm)	Solução de armazenamento	Parte do inseto
02	1,4	0,4	Etanol 70% (v/v)	corpo e cabeça
03	4,4	0,6	Etanol 70% (v/v)	corpo e cabeça
05	1,3	0,4	Etanol Absoluto	corpo e cabeça
07	9,2	0,8	Etanol Absoluto	corpo e cabeça
09	156,0	2,0	Etanol 70% (v/v)	cabeça
10	180,6	2,0	Etanol 70% (v/v)	corpo sem intestino
11	67,7	1,5	Etanol 70% (v/v)	cabeça
12	84,8	1,5	Etanol 70% (v/v)	corpo sem intestino
13	116,2	2,0	Etanol Absoluto	cabeça
14	70,3	1,5	Etanol Absoluto	cabeça
15	73,7	1,5	Etanol Absoluto	corpo sem intestino
16	98,4	2,0	Etanol Absoluto	corpo sem intestino
23	293,8	2,7	Etanol 70% (v/v)	corpo sem intestino
24	512,0	2,7	Etanol 70% (v/v)	cabeça
25	284,4	2,7	Etanol Absoluto	corpo sem intestino

Extração de DNA e Otimizações

Para a execução das análises, partiu-se do protocolo descrito por Rogers e Bendich (1988), no qual foram implementadas modificações. Tais alterações basearam-se nas funções de cada um dos reagentes empregados no processo de extração de DNA. Os procedimentos foram realizados utilizando-se capela de exaustão. Inicialmente as amostras foram transferidas para microtubos de 1,5 mL, congeladas em nitrogênio líquido e maceradas com auxílio de pistilo de ponta cônica (**Figuras 3 A e B**). Posteriormente, foram adicionados 480 μ L (corpo sem intestino) ou 240 μ L (insetos pequenos ou somente cabeça) de tampão de extração, contendo Tris-HCl 200 mM (pH 8,0), EDTA 70 mM, NaCl 2 M, BSA 2% (p/v), PVP 2% (p/v) e β -mercaptoetanol 5% (v/v). Em seguida, adicionaram-se 120 μ L (corpo sem intestino) ou 60 μ L (insetos pequenos ou somente cabeça) de CTAB 10% (p/v) e 5 μ L de proteinase K 10 mg/mL, incubando-se em banho-maria a 65 °C por 60 minutos.

Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm durante 10 minutos, a fase aquosa foi recuperada, transferida para outro microtubo e foram adicionados 500 μ L clorofórmio:octanol (24:1). Após homogeneização branda por inversão durante 5 minutos, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos, sendo a fase aquosa transferida para outro microtubo. À fase aquosa, foram adicionados 45% do volume de acetato de amônio 10 M e igual volume de isopropanol absoluto a -20 °C. Após homogeneização, as amostras permaneceram por duas horas a -20 °C e foram centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 300 μ L de etanol 70% (v/v). Após centrifugação a 14.000 rpm por 5 minutos, o resíduo de etanol foi descartado e os precipitados foram

secos em centrífuga a vácuo por 5 minutos. Posteriormente, as amostras de insetos pequenos ou somente das cabeças foram ressuspensas em 30 μ L de tampão TE contendo RNase A (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM, RNase A 40 μ g/mL; pH 8,0), enquanto aquelas amostras utilizando o corpo sem intestino foram ressuspensas num volume de 100 μ L. A quantidade e qualidade das amostras foram verificadas em gel de agarose 0,8% (p/v) em tampão TAE 1X. Para isso, 5 μ L de cada amostra foram misturados com 1 μ L solução de GelRed diluída 1:1000. As amostras foram submetidas à eletroforese a 80 V por 30 minutos e visualizadas no fotodocumentador Gel Logic 200 (Kodak, Rochester, USA) sob luz ultravioleta. As amostras de DNA foram armazenadas a -20 °C.

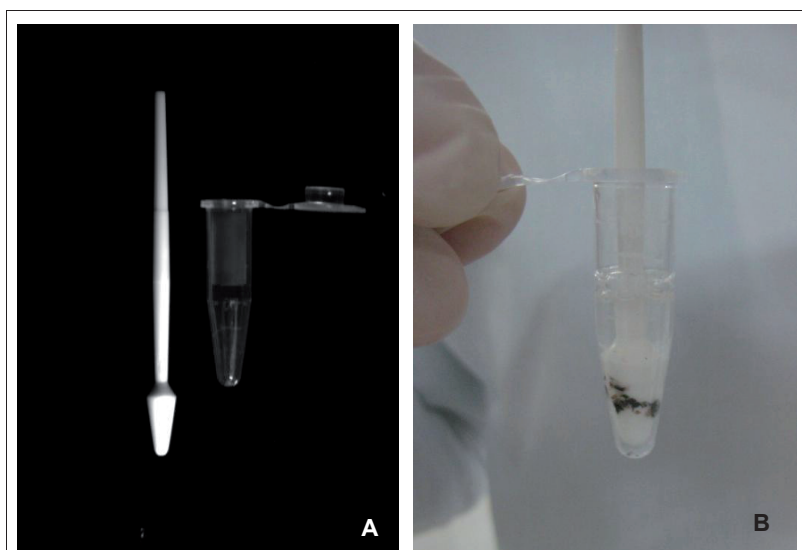


Figura 3. Extração de DNA de *S. frugiperda*. (A) Pistilo cônico e microtubo de 1,5 ml empregados na maceração das amostras. (B) Cabeça da lagarta já macerada com nitrogênio líquido contendo o tampão de extração de DNA.

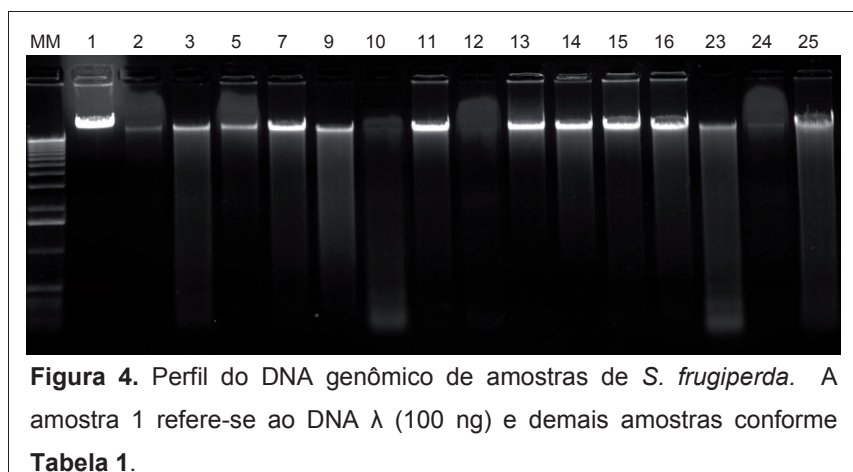
Resultados e Discussão

Com relação às soluções de preservação, constatou-se a inviabilidade da utilização da solução de etanol 70% (v/v) por causa da degradação das amostras. As amostras em álcool absoluto mantiveram-se bem preservadas, permitindo a extração de DNA de qualidade comparável ao das amostras vivas (Figuras 4, 5 e 6). As amostras 2, 10, 12 e 24 (Figura 4), 1 e 3 (Figura 5), 2 e 3 (Figura 6), preservadas em álcool 70% (v/v), apresentaram degradação do DNA.

A degradação do DNA das amostras em etanol 70% (v/v) ocorreu por causa da diluição do etanol pela liberação de água das lagartas (KONDIDIE, 2011). O etanol absoluto apresentou-se como meio importante de preservação, considerando as três trocas iniciais da solução por três dias consecutivos, evitando a diluição da solução e posterior manutenção em freezer -20 °C. Além disso, foram empregados insetos vivos, de forma que o DNA não fosse submetido a nenhum processo de degradação antes do início da preservação em etanol. Não houve diferença significativa tanto na quantidade quanto na qualidade do DNA extraído de amostras frescas ou das preservadas em etanol absoluto; o mesmo foi verificado por Clark et al. (2009). Portanto, a preservação em etanol absoluto é importante antes da degradação do DNA, uma vez que durante o processo de coleta e transporte ao laboratório as lagartas podem morrer (KONDIDIE, 2011). Resultados satisfatórios foram verificados para todas as partes do inseto utilizadas na extração de DNA.

O protocolo com modificações empregado na extração de DNA resultou na obtenção de DNA genômico de qualidade, característica importante, uma vez que, ao serem submetidos

à técnica de PCR para amplificação de SSR (microsatélites) de *S. frugiperda*, foram obtidos padrões de eletroferograma sem interferências e com alta resolução (Figura 7). É importante que se tenha isolamento de DNA genômico de qualidade para aplicações na biologia molecular, como em estudos de diversidade.



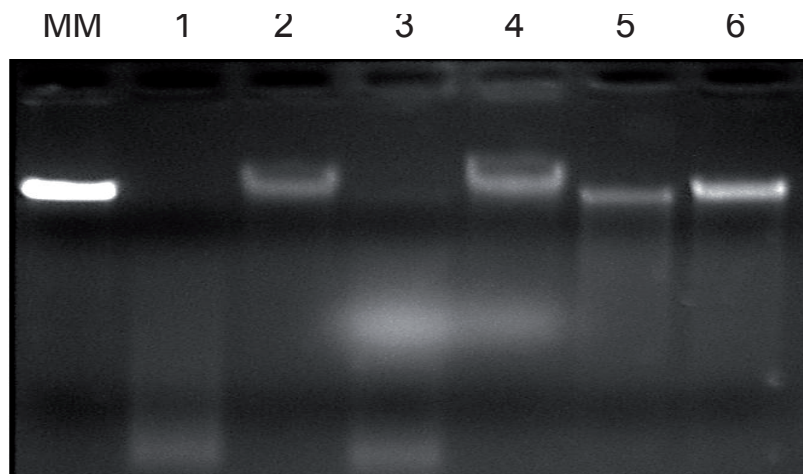


Figura 5. Perfil de DNA genômico de amostras de *S. frugiperda*.

λ – Padrão de DNA λ (100 ng)

1- Cabeça da lagarta preservada em álcool 70% (v/v)

2- Cabeça da lagarta viva

3- Corpo (sem intestino) da lagarta em álcool 70% (v/v)

4- Corpo (sem intestino) da lagarta viva

5- Pernas do adulto preservadas em álcool 70%

6- Pernas do adulto vivo

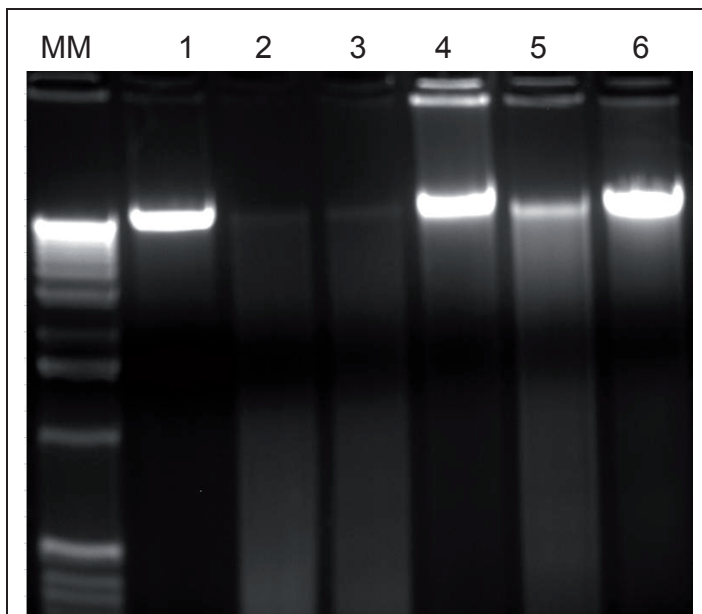


Figura 6. Perfil de amostras de DNA genômico de *Spodoptera frugiperda*.

MM- Marcador molecular de 1Kb

1 - Padrão de DNA λ (100 ng)

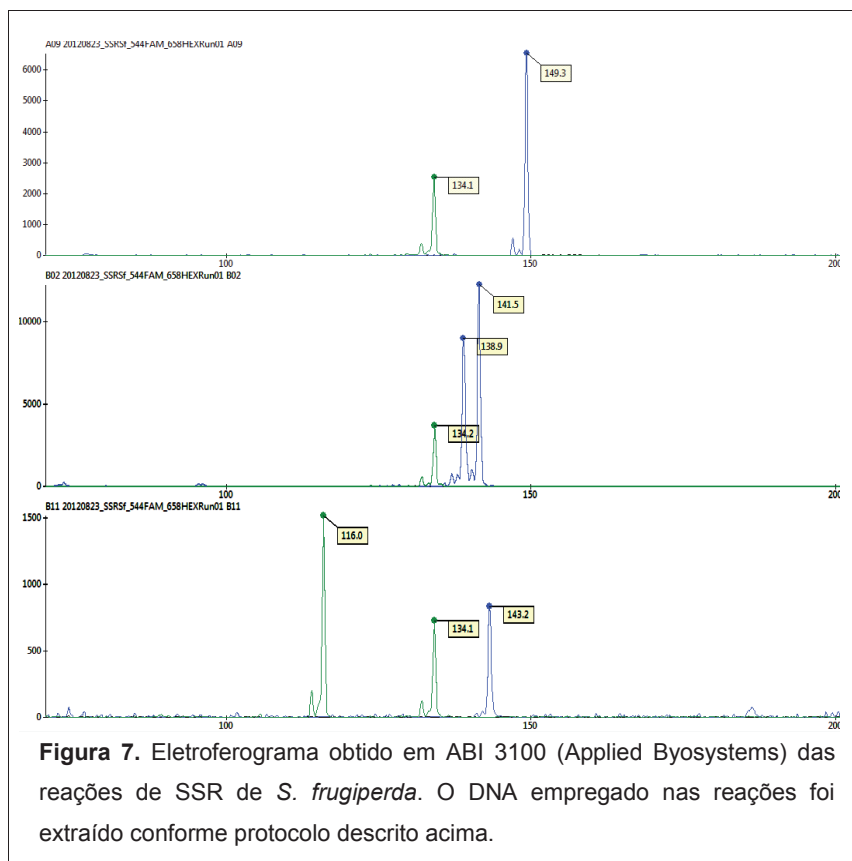
2 -Cabeça da lagarta em etanol 70% (v/v)

3-Corpo (sem intestino) em etanol 70% (v/v)

4-Cabeça da lagarta em etanol absoluto

5-Corpo (sem intestino) em etanol absoluto

6-DNA extraído da cabeça do inseto vivo.



Conclusões

A preservação de amostras de lagartas *S. frugiperda* em etanol absoluto, a partir de indivíduos vivos, com troca da solução em três dias consecutivos e mantidas na mesma solução por até 10 dias em freezer a -20 °C, apresentou-se satisfatória para a posterior extração de DNA. A qualidade do DNA obtida por meio do protocolo com otimizações foi confirmada em eletroforese em gel de agarose e também por meio da análise de SSR de *S. frugiperda*, com resultados semelhantes àqueles obtidos quando realizada a extração do inseto vivo.

Agradecimentos

Ao assistente Célio Ramos das Neves pelo apoio na execução das atividades em laboratório.

Fotos ilustrativas dos procedimentos e das lagartas foram feitas por Beatriz de Almeida Barros e Henrique Albano Rafael

Referências

ALJANABI, S. M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic Acids Research**, London, v. 25, p. 4692-4693, 1997.

BOREGAS, K. G. B.; MENDES, S. M.; WAQUIL, J. M.; FERNANDES, G. W. Estágio de adaptação de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (*Lepidoptera: Noctuidae*) em hospedeiros alternativos. **Bragantia**, Campinas, v. 72, n. 1, p. 61-70, 2013.

CALDERÓN-CORTÉS, N.; QUESADA, M.; CANO-CAMACHO, H.; ZAVALA-PÁRAMO, G. A simple and rapid method for DNA isolation from xylophagous insects. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 12, p. 5056-5064, 2010.

CLARK, M. S. (Ed.). **Plant molecular biology**: a laboratory manual. Berlin: Springer-Verlag, 1997.

CLARK, P. L. D. J.; ISENHOUR, S. R.; SKODA, J.; MOLINA-OCHOA, C.; GIANNI, I.; FOSTER, J. E. Lyophilization of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae yields

high-quality DNA for use in AFLP genetic Studies. **International Journal of Tropical Insect Science**, Wallingford, v. 29, p. 79-85, 2009.

COUCH, J. A.; FRITZ, P. J. Isolation of DNA from plant high in polyphenolics. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 8, p. 8-12, 1990.

HENRY, J. M.; RAINA, A. K.; RIDGWAY, R. L. Isolation of high molecular-weight DNA from insects. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 185, n. 1, p. 147-150, 1990.

HILL, C. A.; GUTIERREZ, J. A. A method for extraction and analysis of high quality genomic DNA from ixodid ticks. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 17, n. 2, p. 224-227, 2003.

HORNE, E. C.; KUMPATLA, S. P.; PATTERSON, M. G.; THOMPSON, S. A. Improved high-throughput sunflower and cotton genomic DNA extraction and PCR fidelity. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 8, p. 8-12, 2004.

JUEN, A.; TRAUGOTT, M. Amplification facilitators and multiplex PCR: tools to overcome PCR-inhibition in DNA-gut-content analysis of soil-living invertebrates. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 38, p. 1872-1879, 2006.

KIM, C. S.; LEE, C. H.; SHIN, J. S.; CHUNG, Y. S.; HYUNG, N. I. A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP. **Nucleic Acids Research**, London, v. 25, p. 1085-1086, 1997.

KONDIDIE, D. B. **Genetic variability and gene flow of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) in the Western Hemisphere and susceptibility to insecticides**. 2011. Thesis (Doctor of Entomology) - University of Nebraska, Lincoln.

LI, J.T.; YANG, J.; CHEN, D. C.; ZHANG, X. L.; TANG, Z. S. An optimized mini-preparation method to obtain high-quality genomic DNA from mature leaves of sunflower. **Genetics and Molecular Research**, v. 6, n. 4, p. 1064-1071, 2007.

POGUE, M. G. **A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae)**. Philadelphia: American Entomological Society, 2002. (Memoirs of the American Entomological Society, 43).

PUCHOOA, D. A. A simple, rapid and efficient method for the extraction of genomic DNA from lychee (*Litchi chinensis* Sonn.). **African Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 253-255, 2004.

REINEKE, A.; KARLOVSKY, P.; ZEBITZ, P.W. Preparation and purification of DNA from insects for AFLP analysis. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 7, p. 95-99, 1998.

ROGERS, O. S.; BENDICH, A. J. Extraction of DNA from plant tissues. In: GELVIN, S. B.; SCHILPEROORT, R. A. **Plant molecular biology manual**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1988. p. 73-83.

SAHA, S.; CALLAHAN, F. E.; DOLLAR, D. A.; CREECH, J. B. Cotton improvement: effect of lyophilization of cotton tissue on quality of extractable DNA, RNA, and protein. **The Journal of Cotton Science**, v. 1, p. 10-14, 1997.

SUL, I. W.; KORBAN, S. S. A highly efficient method for isolating genomic DNA from plant tissues. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, Rehovot, v. 2, p. 113-116, 1996.



Milho e Sorgo

CGPE 10792



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

